

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Bahan Penelitian

##### 4.1.1 Bahan untuk Sintesis

- (1) *2-Hidroxy-5-Methoxybenzoic acid* (Aldrich)
- (2) *4-Nitrobenzoyl chloride* (Fluka)
- (3) *Triethylamine* (Merck)
- (4) *Tetrahydrofuran* (E.Merck)
- (5) Es Batu

##### 4.1.2 Bahan untuk Uji Kromatografi

- (1) *Ethyl Acetate* (Malinckrodt)
- (2) *Methanol* (SAP Chemical)
- (3) *Aceton* (SAP Chemical)
- (4) Ethanol 70%
- (5) Air Suling

##### 4.1.3 Bahan untuk Identifikasi Struktur

- (1) Senyawa hasil modifikasi struktur Asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisisililat
- (2) *Dimethyl sulfoxide-D6* untuk spektroskopi NMR (Merck)
- (3) *Methanol* (SAP Chemical)
- (4) KBr p.a untuk Inframerah (Merck)

##### 4.1.4 Bahan untuk Uji Aktivitas

- (1) Senyawa hasil modifikasi struktur Asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisisililat
- (2) Acetosol (PT. Brataco)
- (3) Metil Selulosa Natrium 0,5 %
- (4) Asam asetat glacial 0,6 %
- (5) *Aqua pro injection*
- (6) *Swab Alkohol*
- (7) *Water pro injection*

#### 4.1.5 Hewan coba

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan harus dipertimbangkan berdasarkan sensitivitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, kecepatan tumbuh serta mudah tidaknya cara penanganan sewaktu dilakukan percobaan. Hewan yang digunakan harus sehat; asal, jenis dan galur, jenis kelamin, usia serta berat badan harus jelas.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit dikarenakan ukurannya dan kemudahan penanganannya. Oleh karena itu, dipilih mencit putih, jantan, dewasa, berusia 6-8 minggu, berat badan 20-30 gram, sehat tidak kelainan yang tampak pada bagian tubuh dan jika digunakan mencit betina sebaiknya tidak dalam keadaan hamil. Sebelum percobaan, mencit tidak diberi makan selama semalam namun masih diberi minum. Mencit dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu :

- (1) Kelompok senyawa asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat dengan dosis 100 mg/kgBB, sebanyak 6 ekor
- (2) Kelompok senyawa asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat dengan dosis 50 mg/kgBB, sebanyak 6 ekor
- (3) Kelompok senyawa asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat dengan dosis 25 mg/kgBB, sebanyak 6 ekor
- (4) Kelompok Pembanding senyawa Aspirin dengan dosis 100 mg/kgBB, sebanyak 6 ekor
- (5) Kelompok Pembanding senyawa Aspirin dengan dosis 50 mg/kgBB, sebanyak 6 ekor
- (6) Kelompok Pembanding senyawa Aspirin dengan dosis 25 mg/kgBB, sebanyak 6 ekor
- (7) Kelompok kontrol larutan (CMC-Na), sebanyak 6 ekor

#### 4.2 Alat Penelitian

##### 4.2.1 Alat-alat untuk Sintesis

- (1) Corong pisah (Pyrex)
- (2) *Hotplate* (Lab Tech)
- (3) *Magnetic Stirrer*
- (4) Gelas Ukur (Pyrex)
- (5) *Beaker Glass* (Pyrex)

- (6) Labu Alas Bulat
- (7) *Vacuum Buchner* (Welch)
- (8) Rotavapor (Heidolph)
- (9) Timbangan elektrik (Ohaus)
- (10) Kertas saring *Whatmann*
- (11) Termometer
- (12) Pipet Tetes
- (13) Corong Gelas (Herma)
- (14) *Alumunium foil*
- (15) Seperangkat alat Destilasi Uap

#### 4.2.2 Alat untuk Uji Kemurnian

- (1) Bejana Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
- (2) Pipa kapiler
- (3) TLC silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck)
- (4) Lampu UV 254 nm
- (5) Alat penentu jarak lebur (*Melting-point Stuart*)

#### 4.2.3 Alat untuk Identifikasi Struktur

- (1) Spektrofotometer UV-Vis
- (2) Spektrofotometer IR
- (3) Spektrometer resonansi magnet inti (<sup>1</sup>H-NMR)

#### 4.2.4 Alat untuk Uji Aktivitas

- (1) Labu Ukur
- (2) Neraca analitik
- (3) Timbangan mencit
- (4) Jarum suntik dan *Injection Disposable syringe*
- (5) *Stopwatch*
- (6) Mortir dan Stamper
- (7) Wadah mencit beserta tutupnya

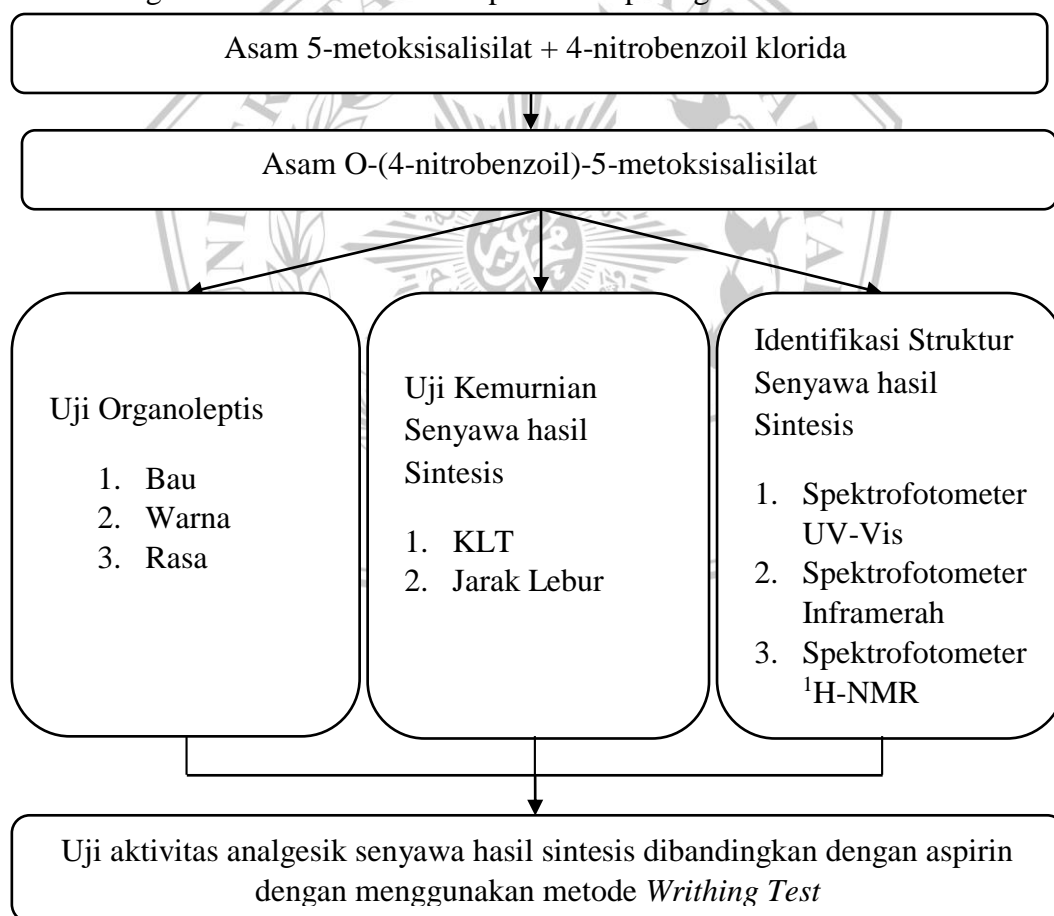
#### 4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Dalam pengerjaan penelitian ini waktu yang dibutuhkan adalah dalam kurun waktu 4 bulan. Kemudian untuk melaksanakan penelitian senyawa hasil sintesis dan identifikasi struktur senyawa yang dilakukan di tempat berikut ini :

- (1) Laboratorium Kimia Terpadu II Universitas Muhammadiyah Malang
- (2) Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang
- (3) Laboratorium Formulasi Sediaan Farmasi
- (4) Laboratorium Kimia Medisinal Universitas Airlangga
- (5) Laboratorium Analisis Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
- (6) Laboratorium Sintesis Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

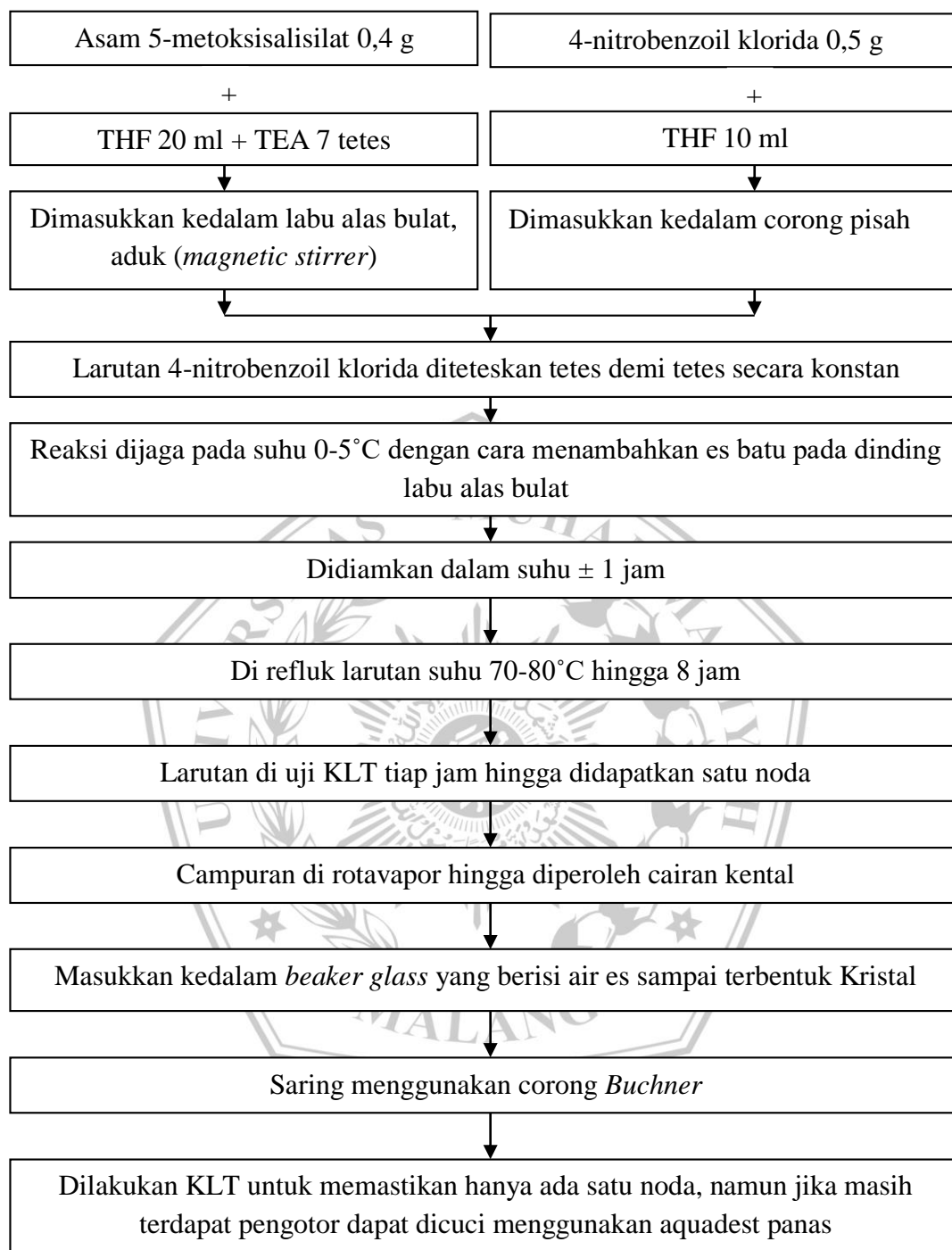
#### 4.4 Prosedur Penelitian

Kerangka Prosedur Penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1 dibawah ini :



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

#### 4.4.1 Prosedur Sintesis Senyawa Asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat



Gambar 4.2 Bagan Prosedur Sintesis Senyawa Asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat

Dilakukan Sintesis senyawa asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat dengan mereaksikan Asam 5-metoksisalisilat sebanyak 0,4 g dilarutkan dalam

*tetrahydrofuran* (THF) 20 ml dalam Labu alas bulat, kemudian ditambah 7 tetes *Triethylamin* (TEA) dan diaduk dengan *magnetig stirrer* selama 15 menit. Ditimbang 4-nitrobenzoil klorida 0,5 g dilarutkan dalam 10 ml *tetrahydrofuran*, (THF) dan dimasukkan kedalam corong pisah. Larutan 4-nitrobenzoil klorida diteteskan secara konstan sampai habis kedalam larutan asam 5-metoksisalisilat selama  $\pm 1-2$  jam. Didalam penetesan harus dilakukan pengadukan dan penjagaan pada suhu  $0-5^{\circ}\text{C}$  dengan cara menambahkan es batu pada dinding luar labu alas bulat.

Larutan kemudian didiamkan selama  $\pm 30$  menit pada suhu kamar dan dilanjutkan dengan merefluks larutan pada suhu  $70-80^{\circ}\text{C}$  selama 7-8 jam. Larutan diperiksa menggunakan KLT tiap jam hingga didapatkan noda dengan Rf yang berbeda dari noda senyawa induk Asam 5-metoksisalisilat pada plat KLT. Kemudian sisa pelarut dihilangkan dari larutan dengan menggunakan Rotavapor sampai terbentuk cairan yang kental. Hasil sintesis yang berupa Kristal dicuci dengan cara meneteskan aquadest dingin sebanyak 75 ml dan sambal disaring menggunakan corong *Buchner*.

Diperiksa noda dengan KLT hingga noda yang terbentuk tidak berubah. Tiap pencucian diperiksa noda dengan KLT dan pencucian hanya diulang apabila masih belum terbentuk 1 noda. Untuk mendapatkan Kristal yang kuning keputihan dilakukan pencucian dengan melarutkan pada aquadest panas selama 30 menit, kemudian disaring menggunakan corong pisah dan dikeringkan menggunakan corong *Buchner*.

#### 4.4.2 Prosedur Uji Kemurnian Senyawa Asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat

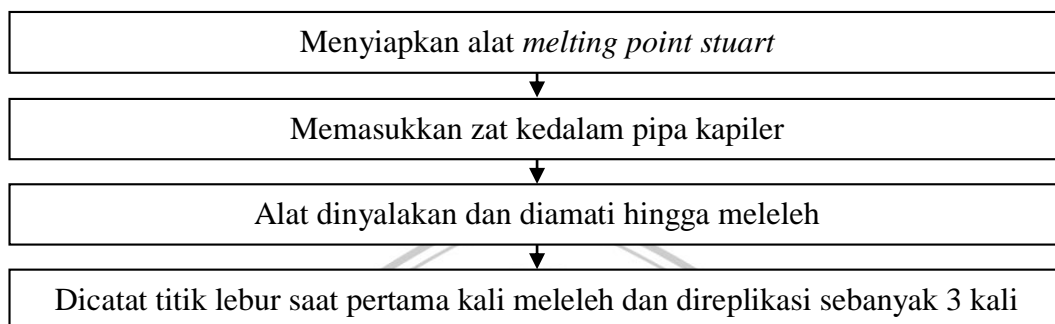
##### (1) Uji Organoleptis

Pemeriksaan yang dilakukan meliputi bentuk, warna, dan bau secara visual. Pemeriksaan warna dengan menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ .

##### (2) Uji Penentuan Jarak Lebur

Penentuan dilakukan dengan menggunakan alat *Melting point stuart*. Zat digerus sampai halus lalu dimasukkan kedalam pipa kapiler tempat senyawa, yang salah satu ujungnya telah tertutup. Kemudian pipa kapiler dimasukkan pada alat. Alat dihubungkan dengan sumber listrik dan saklar pada posisi hidup. Alat diatur

pada suhu  $10^{\circ}\text{C}$  dibawah titik lebur Asam 5-metoksisalisilat. Dilakukan pemeriksaan sebanyak 3 kali dengan menurunkan suhu alat, lalu dilakukan pengulangan. Jarak lebur tersebut dicatat pada 3 kali percobaan dan dipastikan zat mulai meleleh sampai dengan zat meleleh semua. Titik lebur merupakan sebuah titik terjadi perubahan materi dari padat ke cair. Senyawa murni memiliki jarak tidak lebih dari  $2^{\circ}\text{C}$  (O Bryan, 2009).



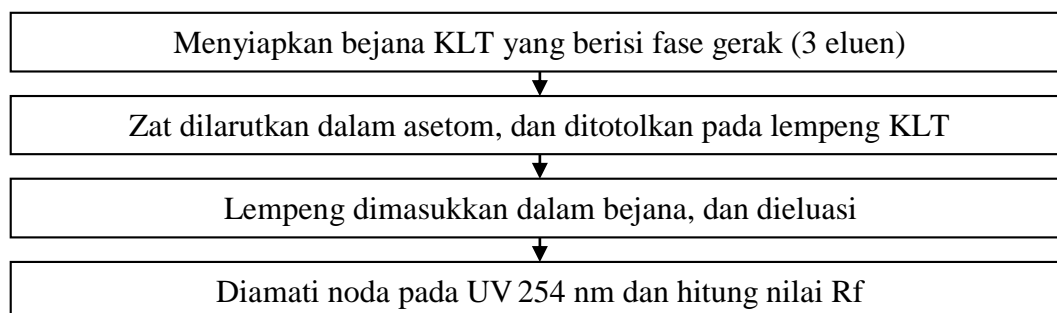
Gambar 4.3 Bagan Prosedur Penentuan Titik Lebur

### (3) Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis

Pemeriksaan kualitatif dengan menggunakan kromatografi lapis tipis bertujuan untuk melihat adanya pengotor dari hasil samping reaksi sintesis. Uji KLT dilakukan dengan menggunakan lempeng silica gel 60 GF<sub>254</sub> sebagai fase diam dan campuran pelarut sebagai fase gerak juga penampak noda lampu UV 254 nm. Eluen yang digunakan sebagai fase gerak adalah :

- a. Etil asetat : Metanol (7 : 3)
- b. Aseton : Metanol (5 : 5)
- c. Aseton : Etanol (9:1)

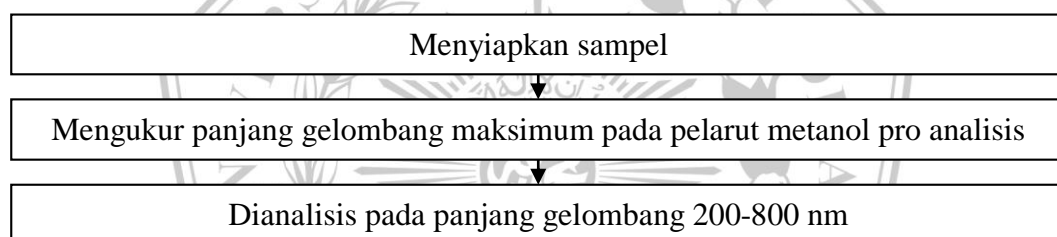
Pertama, bejana KLT diisi menggunakan berbagai eluen, kemudian didiamkan sampai jenuh. Zat hasil sintesis dan asam asetil salisilat sebagai pembanding masing-masing dilarutkan kedalam aseton, lalu ditotolkan pada lempeng KLT dengan batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1,5 cm, dilanjutkan dengan memasukkan lempeng KLT kedalam bejana KLT. Selanjutnya diekspansi hingga pelarut mencapai batas atas lempeng KLT. Setelah selesai, lempeng diangkat dan dikeringkan. Penampak noda dapat diamati dengan lampu sinar UV dan menghitung harga R<sub>f</sub>.



Gambar 4.4 Bagan Prosedur Uji Kromatografi Lapis Tipis

#### 4.4.3 Prosedur Identifikasi Struktur Senyawa Asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat

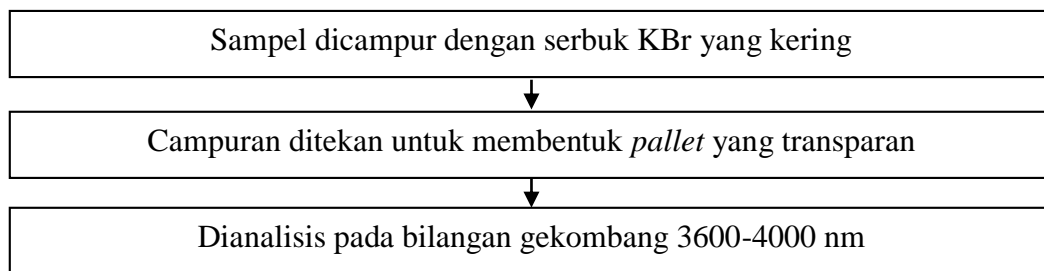
Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri atas suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang 200-800 nm. (Gandjar dan Rohman, 2018).



Gambar 4.5 Bagan Prosedur Identifikasi Struktur Spektrofotometer UV-Vis

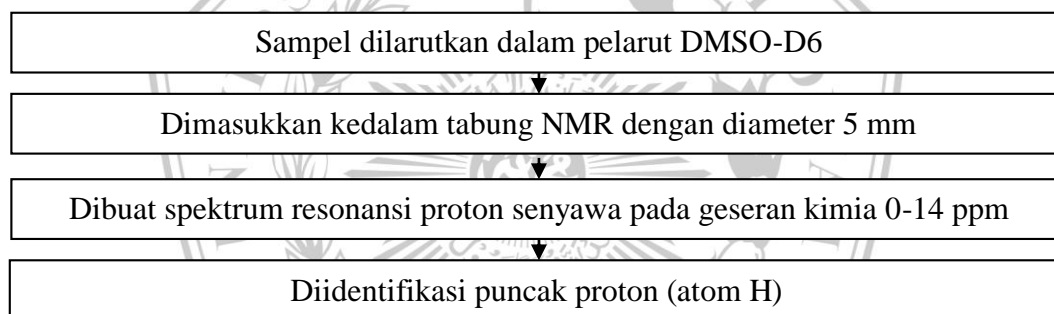
Sebanyak 5 mg sampel dicampur dengan serbuk KBr yang kering sekitar 100 mg. Agar merata secara efisien, gerus di dalam mortir. Campuran kemudian dipres untuk membentuk pellet yang transparan. Siapkan kloroform dan masukkan campuran tersebut pada cetakan. Adanya air harus diminimalkan dengan pompa *vacuum*, dengan cara menghubungkan cetakan dengan pompa *vacuum*, membutuhkan waktu selama 5 menit, dan letakkan cetakan pada pompa hidrolik dan berikan tekanan sampai angka 80. Kemudian matikan pompa vakum setelah selesai dan letakkan pellet KBr yang telah terbentuk pada *tablet holder* dan lakukan pengukuran menggunakan alat spektrofotometer IR (Ifada *et al*, 2013). Bagan prosedur identifikasi struktur dengan spektrofotometer IR dapat dilihat pada gambar 4.6.





Gambar 4.6 Bagan Prosedur Identifikasi Struktur Spektrofotometer Inframerah

Sebanyak 5 mg dari hasil sintesis dilarutkan dalam dimetil sulfoksida deuterated (DMSO-D<sub>6</sub>) kemudian dimasukkan dalam tabung kapiler NMR yang berdiameter 5 mm, lalu tabung diletakkan diantara 2 magnet utara dan selatan pada alat, dibuat spektrum resonansi proton senyawa pada daerah geseran kimia 0,14 ppm. Setelah itu mengidentifikasi posisi puncak-puncak proton (atom H) spektrum resonansi magnet inti yang diperoleh (Silverstein, 2005).



Gambar 4.7 Bagan Prosedur Identifikasi Struktur Spektrometer <sup>1</sup>H-NMR

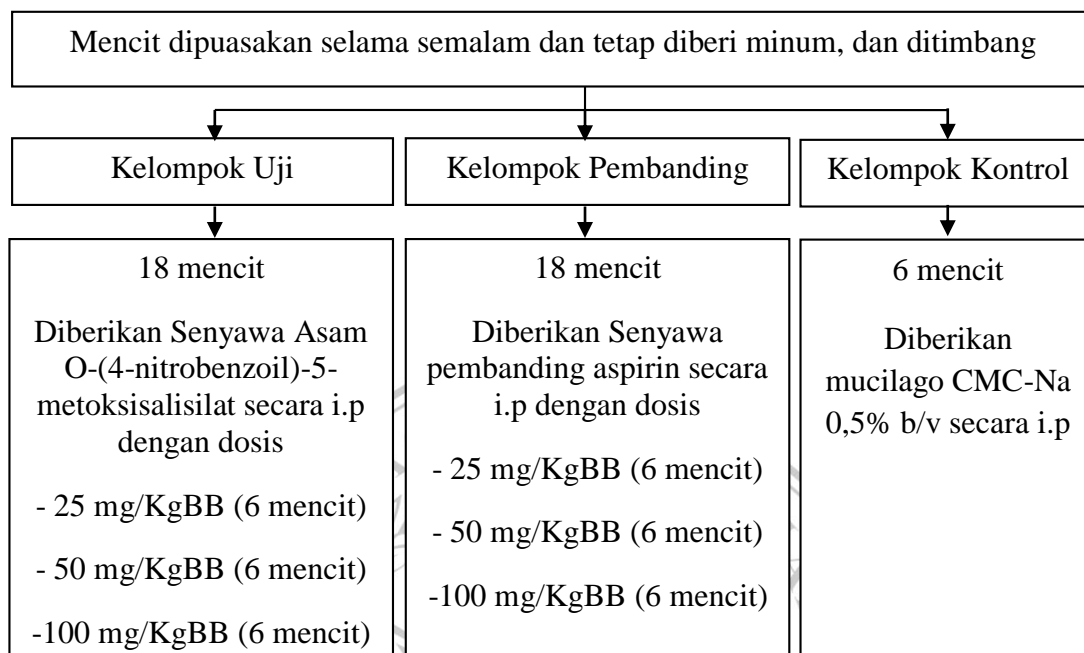
#### 4.4.4 Prosedur Uji Aktivitas Analgesik

Aktivitas analgesik ditentukan dengan metode penghambatan nyeri terinduksi secara kimiawi (*Writhing test*) yang dilakukan pada mencit. Sebagai penginduksi nyeri digunakan larutan asam asetat glasial 0,6 % (Dyah dkk., 2002).

##### (1) Persiapan Hewan Coba

Sejumlah mencit yang memiliki bobot 20-30 gram dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok uji asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisisilisilat (100,50, dan 25 mg/kgBB), masing-masing kelompok 6 ekor. Kelompok pembanding aspirin (100,50, dan 25 mg/kgBB) masing-masing 6 ekor. Sebelum percobaan, mencit jantan putih dipuasakan semalam tetapi tetap diberi minum. Mencit dikelompokkan uji diberi senyawa asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisisilisilat dengan

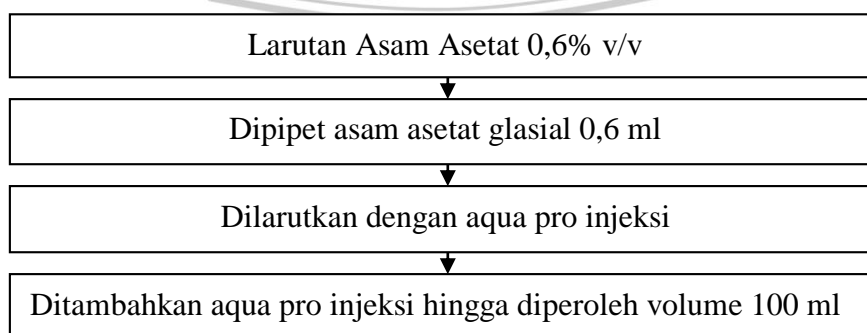
dosis (100,50 dan 25 mg/kgBB), kelompok pembanding diberi aspirin dengan dosis (100,50, dan 25 mg/kgBB), sedangkan kelompok kontrol hanya diberi musilago natrium karboksil metil selulosa.



Gambar 4.8 Bagan Prosedur Persiapan Hewan Coba

(2) Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6%

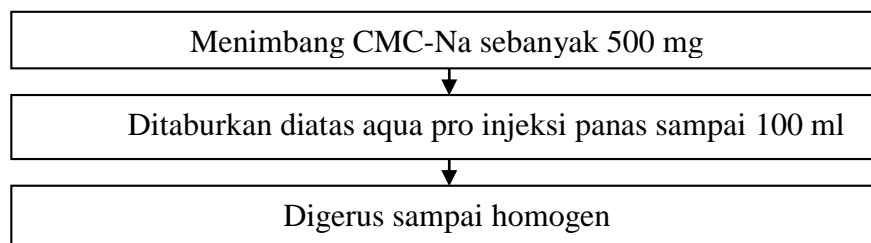
Dipipet asam asetat glasial 0,6 ml dimasukkan kedalam labu ukur, diencerkan dengan aqua pro injeksi dan tambahkan lagi aqua pro injeksi hingga diperoleh volume 100 ml.



Gambar 4.9 Bagan Prosedur Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6 %

(3) Pembuatan suspensi CMC-Na 0,5 %

Menimbang sebanyak 500 mg CMC-Na dalam pembuatan suspensi untuk 100 ml. Kemudian ditaburkan diatas aqua pro injeksi panas hingga diperoleh volume 100 ml (Dyah dkk, 2002).



Gambar 4.10 Bagan Prosedur Pembuatan Suspensi (CMC-Na 0,5%)

(4) Perhitungan Dosis

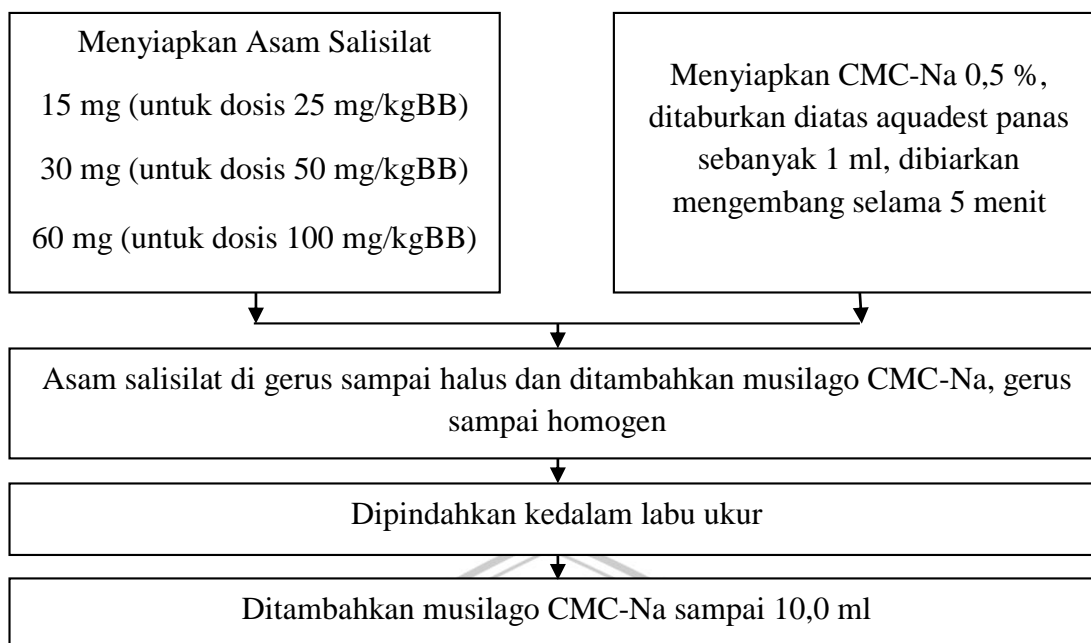
Dosis senyawa uji yang digunakan adalah 100 mg/kgBB. Berat mencit yang digunakan 20 gram. Jika menggunakan berat mencit 30 gram, maka perhitungan dosisnya adalah :

- a.  $100 \text{ mg/kgBB} \times 0,03 \text{ kg (BB mencit)} = 3 \text{ mg (dilarutkan dalam 0,5 ml)}$
- b.  $50 \text{ mg/kgBB} \times 0,03 \text{ kg (BB mencit)} = 1,5 \text{ mg (dilarutkan dalam 0,5 ml)}$
- c.  $25 \text{ mg/kgBB} \times 0,03 \text{ kg (BB mencit)} = 0,75 \text{ mg (dilarutkan dalam 0,5 ml)}$

(5) Pembuatan Senyawa Uji dan Senyawa Pembanding

Sediaan senyawa uji yang akan dibuat yaitu suspensi asam O-(4-nitrobenzoil)-5-metoksisalisilat dan senyawa pembandingnya adalah suspensi senyawa aspirin. Suspensi sediaan harus segera dibuat sebelum uji aktivitas dilakukan, dan tidak boleh disimpan untuk waktu yang lama.

Untuk dosis 25,50, dan 100 mg/kgBB, dibutuhkan hasil senyawa sintesis dan asam salisilat masing-masing sebanyak 7,5 mg (untuk dosis 25 mg/kgBB), 15 mg (untuk dosis 50 mg/kgBB, dan 30 mg (untuk dosis 100 mg/kgBB) kemudian digerus dan dicampur merata dan musilago CMC-Na 0,5 % sampai homogen, kemudian dipindahkan kedalam labu ukur dan ditambahkan larutan musilago CMC-Na 0,5 % sampai diperoleh volume 10,0 ml.



Gambar 4.11 Bagan Prosedur Pembuatan Sediaan Pembanding

(6) Pemberian Sediaan Senyawa Uji pada Mencit

Mencit pada kelompok uji dan pembanding akan diberi suspensi sejumlah volume yang sudah ditentukan sehingga jumlah obat yang akan diberikan sesuai dengan masing-masing dosis. Untuk mencit dengan berat 30 gram, senyawa uji yang harus diinjeksikan adalah 0,05 ml. jika mencit bobotnya kurang dari 30 gram, maka volume yang harus diinjeksikan adalah :

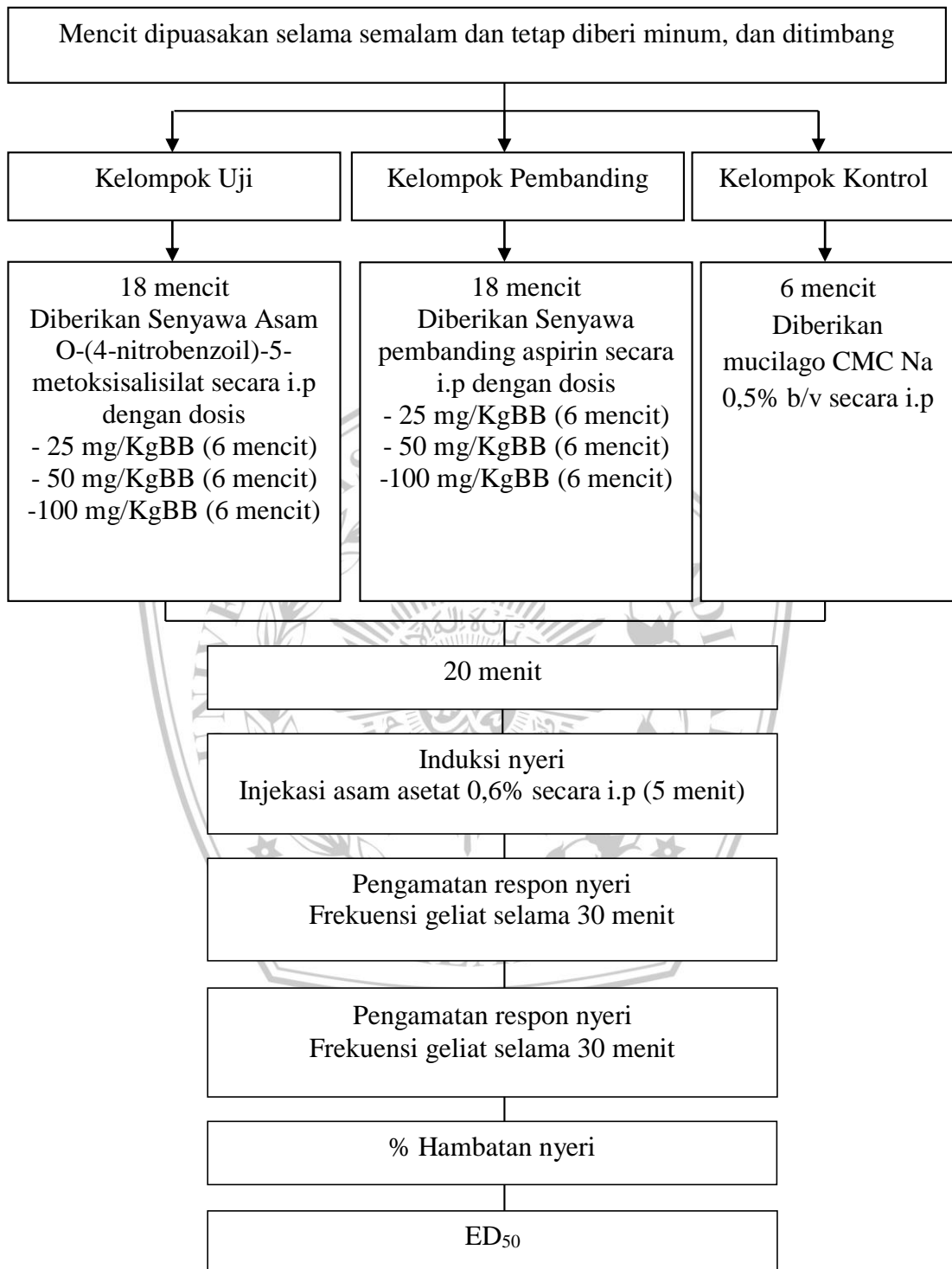
$$\text{Jumlah Sediaan yang diberikan} = \frac{\text{berat badan mencit (gram)}}{30 \text{ gram}} \times 0,5 \text{ ml}$$

$$\text{Misalkan berat badan } 20 \text{ gram} = \frac{20 \text{ gram}}{30 \text{ gram}} \times 0,5 \text{ ml} = 0,33 \text{ ml}$$

(7) Pelaksanaan uji Aktivitas

Menyiapkan mencit yang telah ditimbang sebelumnya, diberi tanda pada ekornya dan dicatat bobot dari mencit tersebut. Kemudian mencit diberi sediaan dosis tertentu secara *intraperitoneal* (i.p). Lalu dibiarkan selama 20 menit, setelah pemberian sediaan, mencit tersebut di injeksi dengan larutan asam asetat 0,6 % sebanyak 3 ml secara i.p. 5 menit kemudian setelah penyuntikan dengan larutan asam asetat glasial 0,6 % (penginduksi nyeri), amati respon nyeri dari mencit yang berupa frekuensi geliat selama 30 menit dan dicatat frekuensi geliat untuk

kelompok uji, pembanding, dan kontrol. Data frekuensi geliat pada tiap kelompok tersebut dihitung rata-rata, sehingga dapat dihitung persen hambatan nyeri.



Gambar 4.12 Bagan Prosedur Uji Aktivitas

#### 4.5 Analisis Data

##### 4.5.1 Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Analgesik

###### (1) Penentuan Frekuensi Respon Nyeri

Tiap mencit pada masing-masing kelompok dilihat respon geliatnya, kemudian dicatat frekuensi geliatnya. Untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna dari aktivitas analgesik dari kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol (dengan tiga dosis yang berbeda), maka dilakukan uji ANOVA yaitu analisis varian satu arah (*One Way ANOVA*) pada  $\alpha = 0,05$ .

Dari data uji aktivitas frekuensi geliat, dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

- a.  $H_0$  = Tidak ada perbedaan bermakna antara frekuensi geliat kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol.
- b.  $H_a$  = Ada perbedaan bermakna antara frekuensi geliat kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol.

Dari data yang diperoleh dan diolah secara statistik dengan program SPSS, kemudian digunakan untuk menguji perbedaan kemaknaan dari kelompok-kelompok diatas. Pengambilan kesimpulan diperoleh dari harga probabilitas (p) pada  $\alpha = 0,05$ . Apabila  $p > 0,05$  maka  $H_0$  diterima dan  $H_a$  ditolak, sebaliknya bila  $p < 0,05$  maka  $H_0$  ditolak dan  $H_a$  diterima (Mukhrizal, dkk, 2013).

###### (2) Penentuan Persentase Hambatan Nyeri

Penentuan hambatan nyeri didapat dari data frekuensi geliat yang kemudian dilakukan perhitungan melalui perbandingan antara kelompok yang diberi senyawa obat (kelompok uji dan kelompok pembanding) terhadap kelompok yang tidak diberi senyawa obat (kelompok kontrol) dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Hambatan nyeri} = \frac{fk - fr}{fk} \times 100$$

Keterangan :

$fr$  = frekuensi geliat rata-rata kelompok uji atau kelompok pembanding

$fk$  = frekuensi geliat rata-rata kelompok kontrol.

(3) Penentuan  $ED_{50}$ 

$ED_{50}$  digunakan untuk melihat aktivitas analgesik pada mencit.  $ED_{50}$  dari aktivitas analgesik adalah dosis yang menghasilkan hambatan nyeri sebesar 50% pada kurva hubungan antara dosis dan % hambatan nyeri. Kurva tersebut diperoleh dari analisis regresi dosis sebagai sumbu x yang merupakan variabel bebas dan % hambatan nyeri sebagai sumbu y yang merupakan variable tergantung.

(1) Persamaan regresi antara log dosis (x) dengan % hambatan nyeri (y) adalah  $y = bx + a$

(2)  $ED_{50}$  dapat dihitung dengan rumus :

$$50 = b (\text{Log } ED_{50}) + a$$

$$ED_{50} = \text{Anti log } \frac{50 - a}{b}$$

